

Potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* isoladas de grãos de milho, da sementeira à colheita, provenientes das regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/SP

Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains in Brazilian corn from sowing to harvest processes.

RIALA6/1020

Adriana P. de ALMEIDA^{1*}; Myrna SABINO¹; Homero FONSECA²; Benedito CORRÊA³

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Divisão de Bromatologia e Química, Seção de Química Biológica, Av. Dr. Arnaldo, 355 CEP 01246-902, São Paulo/ SP, Brasil. Telefone 55 11 30682921, e-mail: maedri@uol.com.br.

² Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, USP, Piracicaba, SP.

³ Instituto de Ciências Biomédicas, USP, São Paulo, SP.

Recebido: 25/11/2004 – Aceito para publicação: 30/06/2005.

RESUMO

O presente estudo visou identificar o potencial toxigênico das cepas de *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides*, isoladas de 57 amostras de grãos de milho e 90 amostras de solo em diferentes estágios de maturidade nas regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/SP, em relação à produção de aflatoxinas e fumonisinas, respectivamente. A análise do potencial toxigênico de *A. flavus*, revelou a produção de aflatoxinas por 13 cepas (92,9%), em concentração de 10,5 a 482,6 µg/kg para aflatoxina B₁ e de 2,9 a 132,5 µg/kg para aflatoxina B₂. Quanto ao potencial toxigênico das 27 cepas de *F. verticillioides*, 100% produziram fumonisinas em concentrações que variaram de 0,1 a 4833,1 µg/g para fumonisina B₁ e de 0,05 a 321,0 µg/g para fumonisina B₂. A concomitante ocorrência de *A. flavus* e *F. verticillioides* e produção de aflatoxinas e fumonisinas, respectivamente, pelos mesmos, nos campos de plantio de milho, indicam a importância de um controle efetivo no cultivo durante os diferentes estágios de maturidade da planta.

Palavras-Chave. aflatoxinas, fumonisinas, grãos de milho, solo e potencial toxigênico.

ABSTRACT

The present study aimed to identify the toxigenic potential of *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains isolated from 57 samples of corn kernels, and 90 samples of soil at different maturity stages from regions of Capão Bonito and Ribeirão Preto, with regards to production of aflatoxins and fumonisins, respectively. The toxigenic potential analysis of 14 *A. flavus* strains revealed the presence of aflatoxins in 13 strains (92.9%) in concentration ranging from 10.47 to 482.58 µg/kg for aflatoxin B₁, and from 2.9 to 132.5 µg/kg for aflatoxin B₂. With reference to toxigenic potential of *F. verticillioides* strains, 27 (100%) produced fumonisins in concentration of 0.10 to 4,833 µg/g of fumonisin B₁, and 0.05 to 321 µg/g of fumonisin B₂. The concomitant occurrence of *A. flavus* and *F. verticillioides* in corn field indicates the importance of an effective control of cultivation throughout the plant maturation stages.

Key Words. aflatoxins, fumonisins, corn grains, soil and toxigenic potential.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é considerado um dos mais importantes cereais cultivados no Brasil. Sua utilização na alimentação humana e animal é conhecida mesmo antes da chegada dos colonizadores ao país, onde o milho já era cultivado e utilizado pelos indígenas. Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, logo após a China, contribuindo com 5,5% do total da produção¹.

Em termos de produção, a qualidade do milho depende muito de sua variedade e práticas culturais. Todos os grãos e cereais são expostos, tanto no campo quanto no armazenamento, à ação de fatores físicos, químicos e biológicos, que interagem entre si favorecendo os processos de deterioração.

A contaminação do milho com aflatoxinas e fumonisinas antes da colheita é um problema sério em vários países. Compreender o processo de contaminação do milho por *Aspergillus flavus* e *Fusarium verticillioides* e os fatores que influenciam a produção de aflatoxinas e fumonisinas, respectivamente, é essencial para que estratégias de controle possam ser criadas.

As aflatoxinas estão entre os mais importantes carcinógenos conhecidos, sendo classificadas na Classe 1 dos carcinógenos humanos pela "International Agency for Research on Cancer" – IARC².

Produzidas, principalmente, por cepas de *A. flavus* e *A. parasiticus*, aparecem contaminando vários tipos de grãos e rações, sendo que o milho é o produto mais citado em literatura, depois do amendoim. Conseqüentemente, altos níveis de aflatoxinas têm sido detectados em quase todas as áreas produtoras do mundo.

As fumonisinas foram primeiramente isoladas de culturas de *F. verticillioides* Sheldon, porém, outras espécies de *Fusarium* têm sido demonstradas como produtoras de fumonisinas³.

O *F. verticillioides*, principal espécie produtora de fumonisinas, ocorre comumente no milho e em outros cereais como, trigo, arroz e aveia. Essa espécie tem larga distribuição na natureza e não ocorre somente em zonas temperadas úmidas e sub-úmidas, mas também, em zonas tropicais e subtropicais.

A "International Agency for Research on Cancer" – IARC classificou as toxinas de *F. verticillioides* como pertencentes a Classe 2B, possivelmente carcinogênicas a seres humanos, embora não haja, ainda, evidências suficientes².

A contaminação do milho recém-colhido por espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* tem sido um problema sério em muitos países. De acordo com estimativas do World Bank Report – Investing in Health⁴, doenças causadas por micotoxinas tendem a reduzir a expectativa de vida nos países em desenvolvimento. Tal fato enfatiza a importância da compreensão da produção de aflatoxinas e fumonisinas por cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, respectivamente, nos campos de cultivo do milho.

Devido à importância toxicológica das micotoxinas, o objetivo do presente trabalho foi verificar a produção de aflatoxinas e fumonisinas por cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, respectivamente, isoladas de amostras de solo e grãos de milho colhidos em diferentes fases de crescimento da planta em duas regiões do Estado de São Paulo, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Potencial toxigênico das cepas de *A. flavus*

As cepas de *A. flavus* foram isoladas de 57 amostras de milho (híbrido XL-251, sementes Braskalb) e 90 amostras de solo provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no período de novembro de 1998 a abril de 1999, conforme descrito em trabalho anteriormente publicado⁵.

De cada cepa isolada dos grãos de milho e solo, foi coletada, com o auxílio de uma alça de platina, um pequeno fragmento da cultura de *A. flavus* mantida em tubo com ágar Sabouraud dextrose a 25°C. O fragmento da colônia foi inoculado no centro de uma placa de Petri contendo ágar côco e incubado a 25°C por 10 dias. Findo o período de incubação a cultura foi analisada quanto à contaminação por aflatoxinas. As culturas em ágar côco foram extraídas, com clorofórmio (30 mL clorofórmio para 10g de cultura) e colocadas em agitação por 30 minutos. O conteúdo foi filtrado em papel de filtro Whatman nº1 e evaporado até a secura. O extrato ressuspenso foi quantificado por cromatografia em camada delgada. A confirmação da identidade das aflatoxinas foi feita através de derivação com ácido trifluoroacético⁶.

Potencial toxigênico das cepas de *F. verticillioides*

Conforme descrito em trabalho anteriormente publicado, as cepas de *F. verticillioides* foram isoladas de 57 amostras de milho (híbrido XL-251, sementes Braskalb) e 90 amostras de solo provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, Estado de São Paulo, no período de novembro de 1998 a abril de 1999¹.

Foi inoculado, em erlenmeyer contendo 50g de arroz esterilizado, 1 ml de suspensão de esporos obtidos do cultivo de cepas de *F. verticillioides* em ágar Sabouraud dextrose a 25 °C. Os erlenmeyers foram incubados por um período de 15 dias a 27 °C seguido por mais um período de 15 dias a 15°C. As amostras de arroz foram submetidas a análise para verificar a contaminação por fumonisinas. Resumidamente, 10g da cultura foram retiradas do erlenmeyer e 50 mL de uma solução 1:1 de acetoneitrila/água foram adicionados. A mistura foi agitada por 30 minutos. O extrato foi filtrado em papel de filtro (Whatman nº1). 2 mL do filtrado foram adicionados a 5mL de água destilada e a mistura foi submetida a minicoluna de troca iônica Varian C-18 (Varian, Harbor City, CA), preconditionada com 2mL de metanol e 2 mL de água Milli Q (Millipore, Belford, MA). A minicoluna foi lavada com 2 mL de acetoneitrila/água (20:80) e a

toxina eluída com 2 mL de acetonitrila/água (70:30). Após a eluição, o extrato foi recolhido em eppendorff e armazenado à temperatura de congelamento até o momento da quantificação.

Uma alíquota de 50µL do extrato foi derivatizada com 200µl de solução de o-ftaldialdeído (OPA) (40 mg de OPA, 1 mL metanol, 5 mL tetraborato de sódio 0.1 M e 50 µL 2-mercaptoetanol), e injeções no cromatógrafo líquido foram feitas dentro de 2 minutos. As fumonisinas foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu LC-10AD, bomba e detector de fluorescência RF-10AXL), usando coluna 5 ODS-20 C₁₈ (150mm x 4,6 mm, Phenomenex - ultracarb). Comprimentos de onda de 335 e 440 nm (excitação e emissão, respectivamente) foram utilizados. Como fase móvel, foi utilizado o sistema acetonitrila : água : ácido acético (1:1:0,5), com vazão de 1,0 ml/min., temperatura ambiente 22-23°C, e temperatura de coluna 24°C. Essa proporção permitiu a obtenção de pressão e viscosidade de fase móvel adequadas, com separação e tempo de retenção: t_r FB₁ = 8 - 10 minutos e t_r FB₂ = 22 - 24 minutos. Os limites de detecção e quantificação do método foram de 15ng/g e 50ng/g, respectivamente, tanto para fumonisina B₁ quanto para fumonisina B₂. A recuperação do método empregado foi de 88% e 94% para FB₁ e FB₂, respectivamente, na concentração de 50ng/g⁵.

RESULTADOS

De cada amostra de milho e solo onde foram isoladas cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, selecionou-se uma cepa

para teste de produção de aflatoxinas e fumonisinas, totalizando 41 testes.

A análise do potencial toxigênico das 14 cepas de *A. flavus* provenientes de 57 amostras de grãos de milho e 90 amostras de solo das regiões de Capão Bonito/SP e Ribeirão Preto/SP, no período de novembro de 1998 a abril de 1999, revelou a produção de aflatoxinas por 13 cepas (92,9%). As concentrações variaram de 10,5 a 482,6 µg/kg para aflatoxina B₁ (AFB₁) e de 2,9 a 132,5 µg/kg para aflatoxina B₂ (AFB₂). Das 13 cepas produtoras, 12 (92,3%) produziram tanto AFB₁ quanto AFB₂ e 1 (7,7%) produziu somente AFB₁ (Tabela 1). A concentração mais elevada de AFB₁ e AFB₂ foi obtida da cepa isolada na região de Ribeirão Preto na 3ª coleta, período correspondente à 75 dias após a emergência da planta (Tabela 1).

A análise do potencial toxigênico de 27 cepas de *F. verticillioides* em 57 amostras de grãos de milho e em 90 amostras de solo, provenientes das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, no período de novembro de 1998 a abril de 1999, revelou a produção de fumonisinas por todas as cepas analisadas (100%), com níveis de concentração entre 0,1 e 4833,1 µg/g para FB₁ e 0,05 e 321,0 µg/g para FB₂. Das 27 cepas produtoras, 1 (3,7%) produziu somente FB₂ e 26 (96,3%) tanto FB₁ quanto FB₂. As concentrações mais elevadas de FB₁ foram obtidas das cepas isoladas nas regiões de Capão Bonito (7ª coleta) e Ribeirão Preto (3ª coleta), períodos correspondentes à 135 e 75 dias após a emergência da planta, respectivamente (Tabela 2). A concentração mais elevada de FB₂ foi obtida da cepa isolada na região de Ribeirão Preto na

Tabela 1. Produção de aflatoxinas por cepas de *Aspergillus flavus* isoladas de amostras de grãos de milho e solo das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, no período de novembro de 1998 a abril de 1999.

Nº da Cepa	Região de Plantio	Estádio de Desenvolvimento da Planta	Procedência	Aflatoxina B ₁ µg/kg	Aflatoxina B ₂ µg/kg
1	CB	8ª C	Solo	26,0	23,9
2	RP	A	Solo	307,0	121,0
3	RP	A	Solo	294,5	91,5
4	RP	1ª C	Solo	287,5	76,6
5	RP	3ª C	Solo	482,6	132,5
6	CB	5ª C	Milho	438,6	17,4
7	CB	7ª C	Milho	130,1	8,1
8	RP	3ª C	Milho	39,5	2,9
9	RP	3ª C	Milho	37,6	3,4
10	RP	4ª C	Milho	218,1	16,8
11	RP	4ª C	Milho	216,4	37,3
12	RP	5ª C	Milho	10,5	ND
13	RP	6ª C	Milho	297,8	12,3

CB = Capão Bonito, RP = Ribeirão Preto; A = antes do plantio; 1ª C = 45 dias após a emergência da planta; 2ª C = 60 dias após a emergência da planta; 3ª C = 75 dias após a emergência da planta; 4ª C = 90 dias após a emergência da planta; 5ª C = 105 dias após a emergência da planta; 6ª C = 120 dias após a emergência da planta; 7ª C = 135 dias após a emergência da planta; 8ª C = 150 dias após a emergência da planta (colheita), ND = aflatoxina não detectada.

4ª coleta, período correspondente à 90 dias após a emergência da planta (Tabela 2).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados revelaram a produção de aflatoxinas por 92,9% das cepas de *A. flavus* isoladas de grãos de milho e solo em níveis que variaram de 10,5 a 482,6 µg/kg para AFB₁ e de 2,9 a 132,5 µg/kg para AFB₂, sendo que em 7,7% delas observou-se somente a produção de AFB₁ e em 92,3% a produção de AFB₁ e AFB₂ (Tabela 1). Achados semelhantes também foram apontados por outros autores, estudando cepas de *A. flavus*

isoladas de grãos de milho^{7,8}. Nesses trabalhos, os autores verificaram a produção de aflatoxinas B₁ e B₂ por *A. flavus* em 76,1% e 72,9% das cepas isoladas de grãos de milho, respectivamente.

No Brasil, cepas toxigênicas de *A. flavus* e *A. parasiticus* foram também isoladas de grãos de milho. Asevedo et al.⁹ constataram que 39,4% das cepas de *A. flavus*, isoladas de grãos de milho armazenados, foram produtoras de AFB₁ e que 100% das cepas de *A. parasiticus* foram produtoras de aflatoxinas B₁, B₂, G₁ e G₂. Almeida et al.¹⁰, trabalhando com grãos de milho recém-colhido, provenientes das regiões de Assis, Capão Bonito e Ribeirão Preto, constataram que 60% das cepas de *A. flavus* isoladas foram produtoras de aflatoxinas

Tabela 2. Concentração de FB₁ e FB₂ em 27 cepas de *Fusarium verticillioides* isoladas de amostras de solo e milho das regiões de Capão Bonito e Ribeirão Preto, no período de novembro de 1998 a abril de 1999.

Número da Cepa	Região de Plantio	Estádio de Desenvolvimento da Planta	Material de Procedência	Fumonisina B ₁ µg / g	Fumonisina B ₂ µg / g
1	CB	5ª Coleta	Solo	0,1	0,05
2	CB	4ª Coleta	Milho	334,0	4,5
3	CB	5ª Coleta	Milho	124,7	0,7
4	CB	6ª Coleta	Milho	115,0	1,3
5	CB	7ª Coleta	Milho	4833,1	127,7
6	CB	8ª Coleta	Milho	172,3	2,3
7	RP	3ª Coleta	Solo	ND	0,05
8	RP	5ª Coleta	Solo	677,7	6,1
9	RP	6ª Coleta	Solo	52,3	0,6
10	RP	6ª Coleta	Solo	2190,8	21,1
11	RP	A	Milho	384,0	2,2
12	RP	A	Milho	283,4	4,7
13	RP	3ª Coleta	Milho	1104,9	40,7
14	RP	3ª Coleta	Milho	90,9	4,5
15	RP	3ª Coleta	Milho	4763,7	300,9
16	RP	4ª Coleta	Milho	60,3	1,7
17	RP	4ª Coleta	Milho	339,7	10,6
18	RP	4ª Coleta	Milho	1585,6	46,2
19	RP	4ª Coleta	Milho	4475,0	321,0
20	RP	4ª Coleta	Milho	1970,5	64,3
21	RP	5ª Coleta	Milho	1088,0	14,0
22	RP	5ª Coleta	Milho	30,30	0,3
23	RP	5ª Coleta	Milho	1770,4	41,2
24	RP	6ª Coleta	Milho	1677,8	36,4
25	RP	7ª Coleta	Milho	544,8	8,6
26	RP	7ª Coleta	Milho	951,2	14,8
27	RP	7ª Coleta	Milho	1837,0	33,2

CB = Capão Bonito, RP = Ribeirão Preto; A = antes do plantio; 1ª = 45 dias após a emergência da planta; 2ª = 60 dias após a emergência da planta; 3ª = 75 dias após a emergência da planta; 4ª = 90 dias após a emergência da planta; 5ª = 105 dias após a emergência da planta; 6ª = 120 dias após a emergência da planta; 7ª = 135 dias após a emergência da planta; 8ª = 150 dias após a emergência da planta (colheita), ND = fumonisina não detectada.

(615,0 µg/kg a 30.750,0 µg/kg para AFB₁ e de 11,0 µg/kg a 22,0 µg/kg para AFB₂). Os níveis mais elevados de AFB₁, comparativamente ao de AFB₂, também confirma os achados de outros pesquisadores^{7,11}.

Em relação à produção de fumonisinas por cepas de *F. verticillioides*, observou-se que a totalidade das cepas avaliadas foram produtoras de fumonisinas (0,1 µg/g a 4833,1 µg/g para FB₁ e 0,05 µg/g a 321,0 µg/g para FB₂). Tais resultados são concordantes com os obtidos em outros trabalhos^{10,12,13}, nos quais a produção de fumonisinas foi constatada em 100% das cepas de *F. verticillioides*. Convém salientar, que os níveis obtidos de FB₁ no presente trabalho também foram similares aos reportados previamente por Visconti e Doko¹³ que observaram a produção de fumonisina B₁ nas 41 cepas de *Fusarium* isoladas de milho, em uma concentração que variou de 0,70 a 4100 µg/g.

As concentrações mais elevadas de FB₁ em relação a FB₂, bem como a produção de ambas as toxinas (FB₁ e FB₂) por 96,3% das cepas *F. verticillioides*, também são observações apontadas na literatura¹².

Outros autores têm relatado a produção de fumonisinas por outras espécies do gênero *Fusarium*, tais como: *F. proliferatum*, *F. napiforme*, *F. anthophyllum* e *F. dlamini*^{3,14}. Entretanto, *F. verticillioides* continua sendo a principal espécie produtora de fumonisinas e aquela encontrada com maior frequência em grãos de milho recém-colhido e armazenado.

A concentração mais elevada de AFB₁ foi obtida da cepa de *A. flavus* isolada na 3ª coleta em Ribeirão Preto, enquanto que a concentração mais elevada de FB₁ foi obtida da cepa de *F. verticillioides* isolada na 7ª coleta em Capão Bonito. Tais resultados demonstram a falta de um padrão de produção de aflatoxinas e fumonisinas no campo por cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides*, respectivamente. Como o potencial toxigênico foi realizado sob condições controladas de laboratório, fica difícil de se avaliar quais os fatores que tiveram maior envolvimento na produção de micotoxinas por cepas de *A. flavus* e *F. verticillioides* isoladas nos diferentes estádios de desenvolvimento.

Não existe trabalho em literatura que tenha avaliado o potencial toxigênico de cepas fúngicas isoladas de grãos de milho em diferentes épocas de plantio. Chulze et al.¹⁵ analisaram amostras de grãos de milho, provenientes da região de Córdoba - Argentina, coletadas em diferentes estádios de desenvolvimento da planta. Nesse trabalho os autores verificaram elevada incidência de *F. verticillioides* e maior produção de fumonisinas aos 75 dias após o florescimento da planta, entretanto não verificaram o potencial toxigênico das cepas de *F. verticillioides*.

Sabe-se que o desenvolvimento de fungos toxigênicos e conseqüente produção de micotoxinas são dependentes de uma complexa série de fatores, como susceptibilidade do substrato à colonização do fungo produtor, fatores físicos e fatores biológicos¹⁶. No presente trabalho a produção de aflatoxinas e fumonisinas por cepas de *Aspergillus* e *Fusarium*,

respectivamente, parece estar relacionada com a capacidade genética do fungo em produzir micotoxinas, uma vez que não houve influência do período de isolamento da cepa na produção de micotoxinas pelas mesmas.

Fatores físicos como, temperatura e umidade também influenciam o crescimento fúngico e a produção de micotoxinas. Os fungos que contaminam os grãos se proliferam em teores de umidade acima de 13,5 %, sendo a atividade de água ideal para o crescimento das principais espécies de fungos toxigênicos acima de 0,76^{17,18}. Segundo esses mesmos autores os valores mínimos de atividade de água para o crescimento de *F. moniliforme* e produção de fumonisinas são 0,87 e 0,90, respectivamente e os valores mínimos de atividade de água para o crescimento de *A. flavus* e produção de aflatoxinas são 0,80 e 0,87, respectivamente. Segundo Lacey et al.¹⁷, tanto as fumonisinas quanto as aflatoxinas são facilmente produzidas quando cepas de *F. moniliforme* e *A. flavus* são cultivadas em grãos de milho a 25°C.

Schindler et al.¹⁹, observaram, em meio de cultura, a produção máxima de aflatoxinas a 24°C, após 5 dias de incubação. Verificaram, também, que o crescimento máximo para este fungo foi obtido nas temperaturas de 24°C e 35°C.

Nelson et al.²⁰ também verificaram que a temperatura ótima para o crescimento de *Fusarium* spp. é de 25°C, durante o dia, e 20°C durante a noite, embora este crescimento também ocorra em temperaturas constantes entre 20 e 25°C, desde que os níveis de Aa sejam adequados.

A constatação de fungos toxigênicos no alimento não significa, automaticamente, a presença de micotoxinas no mesmo, principalmente se estes fungos não estão se desenvolvendo mas, indica que há, potencialmente, o risco de uma possível contaminação por micotoxinas. Se este alimento for, ainda, um bom substrato para produção de micotoxinas e se os fatores abióticos, principalmente umidade e temperatura, forem adequados, os riscos dessa contaminação tendem a aumentar.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro à pesquisa.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Brasileiro de geografia e Estatística [IBGE]. Levantamento sistemático da produção agrícola. [Acesso em 1999 Nov 29] Disponível na URL: <http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin/prtabl>
2. International Agency on Research on Cancer [IARC]. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon: IARC, 1993. v.56.
3. Nelson PE. Taxonomy and biology of *Fusarium verticillioides*. Mycopathologia 1992; 117: 29-36.

4. World Bank Report. Investing in Health. World Development Report 1993. New York: Oxford University Press; 1993.
5. Almeida AP, Corrêa B, Direito GM, Fonseca H, Fancelli AL, Ortega E. Mycoflora and fumonisin contamination in Brazilian corn from sowing to harvest. *J Agric Food Chem*; 2000, 50 (13): 3877-82.
6. Lin MT, Dianese JC. A Coconut-Agar Medium for rapid detection of aflatoxin production by *Aspergillus* spp. *Phytopathology* 1976; 66: 1466-69.
7. Huang CJ, Chuang TY, Tseng TC. Contamination of *Aspergillus flavus* on corn kernels and production of aflatoxin by the fungus in Taiwan. *Plant Protect Bull* 1990; 32: 195-202.
8. Mehan VK, Chohan JS. Aflatoxin B₁ producing of *Aspergillus flavus* Link ex Fries from cotton, maize and wheat. *Mycopathol Mycol Appl* 1973; 49 : 263-74.
9. Asevedo IG, Gambale W, Corrêa B, Paula CR, Souza VM, Almeida RMAD. Mycoflora and aflatoxigenic species of *Aspergillus* spp. isolated from stored maize. *Ver Microbiol* 1994; 25: 46-50.
10. Almeida AP, Corrêa B, Mallozzi MAB, Sawasaki E, Ortega EM. Mycoflora and aflatoxin/fumonisin production by fungal isolates from freshly harvested corn hybrids. *J. Brazilian Soc Microbiol* 2000;31: 321-6.
11. Zevada MZ. Producción de aflatoxinas por cepas aisladas de maíz. *Rev Lat-Am Microbiol* 1971; 13: 263-6.
12. Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham GS, Gelderblom WCA, Nieuwenhuis JJ. Survey of fumonisins production by *Fusarium* species. *Appl Environ Microbiol* 1991; 57 : 1089-93.
13. Visconti A, Doko MB. Survey of fumonisin production by *Fusarium* isolated from cereals in Europe. *JAOAC Int* 1994; 77 : 546-50.
14. Ross PF, Nelson PE, Richard JL, Plattner RD, Rice LG, Osweiler GD, Wilson TM. Production of fumonisin by *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and pulmonary edema syndrome in swine. *Appl Environ Microbiol* 1990; 56: 3224- 6.
15. Chulze SN, Ramirez ML, Farnochi MC. *Fusarium* and fumonisin occurrence in Argentinean corn at different ear maturity stages. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 2797-2801.
16. Ciegler A. Fungi that produce mycotoxins: condition and occurrence. *Mycopathologia* 1978; 65: 5-11.
17. Lacey J, Ramakrishna N, Hamer A, Magan N, Marfleet C. Grain fungi. In: Arora DK, Mukerji KG, Marth EH editors. *Handbook of Applied Mycology: foods and feeds*. New York: Marcel Dekker; 1991.
18. Leitão MF. Microbiologia de alimentos. In: Roitman I, Travassos LR, Azevedo JL editors. *Tratado de Microbiologia*. São Paulo: Ed. Manole; 1988. p.1-81.
19. Schindler AF, Plamer JG, Eisenberg WV. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperature. *Appl Microbiol* 1967; 15: 1006-9.
20. Nelson PE, Touson TA, Marasas WFO. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. Pennsylvania: University Press; 1983.